Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 5, Dec- Jan 2018, p. 784-797

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 5، آذر - دی 1396، ص. 797-784

ارزیابی خواص ضدباکتریایی فیلم زیست‌فعال کیتوزان حاوی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس*

احسان آزادبخت[1]- یحیی مقصودلو[2*]- مرتضی خمیری[3]- محبوبه کشیری[4]

تاریخ دریافت: 1395/04/14
تاریخ پذیرش: 1395/08/08

چکیده

بسته‌بندی ضدمیکروبی یک نوع بسته‌بندی فعال است که مهاجرت پیوسته ترکیبات ضدمیکروبی به سطح ماده غذایی را فراهم می‌سازد. در این تحقیق خاصیت ضدمیکروبی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس علیه* دو باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس*) وگرم منفی (*اشرشیا کلای و سالمونلا اینترتیدیس*) با روش‌های دیسک دیفیوژن ، چاهک میکروپلیت و همچنین تاثیر اسانس اکالیپتوس در محیط مایع و بخارات آن بررسی شد. فیلم زیست کامپوزیت کیتوزان حاوی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* (در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد حجمی/ حجمی) با روش قالب‌گیری تولید و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها در فاز بخار و در تماس مستقیم با محیط مایع مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت بازدارندگی اسانس علیه باکتری‌های گرم منفی و مثبت به‌ترتیب 3/125 و 1/562 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. هم‌چنین قطر هاله بازدارندگی باکتری‌های گرم مثبت از گرم منفی بیشتر بود. ترتیب اثر اسانس روی باکتری‌ها بر اساس اندیس لگاریتم کاهشی به‌صورت: *استافیلوکوکوس اورئوس* > *باسیلوس سرئوس* > *اشرشیا کلای* > *سالمونلا اینترتیدیس بود*. بخار اسانس در ترکیب با فیلم کیتوزان در سطح 1 و 1/5 درصد اسانس قادر به کاهش دانسیته میکروبی بود و همچنین اندیس لگاریتم کاهشی فیلم کیتوزان با افزایش غلظت اسانس از 0/5 به 1/5 درصد در محیط مایع افزایش یافت. بر اساس این نتایج فیلم زیست کامپوزیت کیتوزان حاوی 1/5 درصد اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* در تماس مستقیم با مواد غذایی به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی مناسب در بسته‌بندی مواد غذایی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بسته‌بندی ضدمیکروبی، اسانس اکالیپتوس، کیتوزان

مقدمه

اثرات زیان‌بار نگهدارنده‌های شیمیایی و نگرانی مصرف‌کنندگان سبب افزایش تمایل استفاده از انواع ترکیبات طبیعی گردیده است. ترکیبات ضدمیکروبی در تماس مستقیم ماده غذایی و یا به‌طور غیرمستقیم با قرار دادن در پلیمرهای بسته‌بندی قادر به کاهش یا به تاخیر انداختن رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (Guarda *et al*., 2011). بسته‌بندی ضدمیکروبی یک نوع بسته‌بندی فعال است که مهاجرت پیوسته ترکیبات ضدمیکروبی به سطح ماده غذایی را فراهم می‌سازد به‌طوری که این تداوم رهایش ترکیبات ضدمیکروبی، اجازه رشد به سلول‌های ترمیم یافته میکروبی را نخواهد داد. بنابراین از بسته‌بندی ضدمیکروبی به‌عنوان یک تکنولوژی هردل جهت افزایش امنیت و بهبود کیفیت مواد غذایی یاد می‌شود (Muriel-Galet *et al*., 2012).

تولید پلاستیک‌های زیستی در سال 2010 میلادی 724 هزار تن گزارش شده است. پتانسیل تولید جهانی این پلاستیک‌ها، بر اساس گزارش چشم‌انداز توسعه زیست پلاستیک‌ها در سال 2020، بیش از 3/45 میلیون تن پیش بینی شده است (Shen *et al*, 2010). کیتوزان پلی‌ساکارید پلی‌کاتیونیک و زیست تخریب‌پذیر است که در نتیجه دی‌استیل‌زدایی کیتین به‌دست می‌آید. این پلیمر به‌دلیل وزن ملکولی بالا و حلالیت در محلول‌های اسیدی، توانایی تشکیل ژل و فیلم دارد (Ghanem & Skonbery, 2002) و همچنین این پلیمر کاربردهای فراوانی در پزشکی، غذا، کشاورزی و صنایع شیمیایی دارد (Kurita, 2006). خواص ضدمیکروبی محلول و فیلم کیتوزان به وزن ملکولی کیتوزان (درجه دی‌استیله شدن و وزن ملکولی)، دیگر ترکیبات سیستم (نوع و غلظت اسید، حضور پروتئین، لیپید، یون‌ها و دیگر ترکیبات غذایی) و شرایط محیطی (دما و رطوبت نسبی) وابسته است (Zheng & zhu, 2003; Synowiecki & Al-khateeb, 2003). بنابراین خواص ضدمیکروبی یک فیلم بسته‌بندی تحت تاثیر نوع ترکیب ضدمیکروبی، ماهیت پلیمر و تعامل بین ترکیبات ضدمیکروبی و پلیمر

1، 2، 3 و 4- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(* - نویسنده مسئول: Email: yahyamaghsoudlou@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.57272

قرار دارد (Quintavalla & Vicini, 2002). با توجه به عدم تشابه سرعت رهایش و تبخیر ترکیبات ضدمیکروبی در پلیمرهای آب دوست و آب‌گریز، بروز خواص ضدمیکروبی طی دوره نگهداری در این پلیمرها نیز یکسان نخواهد بود.

گیاه اکالیپتوس بومی استرالیا و از خانواده میرتاسیا[1] می‌باشد که حدود 900 گونه و زیر گونه دارد (Brooker & Kleiling, 2004). اسانس گونه‌های مختلف میرتاسیا علاوه بر فعالیت‌های ضدالتهابی و ضددرد (Silva *et al*., 2003)، به‌عنوان ترکیبات ضدباکتریایی و ضدقارچی در محصولات بهداشتی (Lis-Balchin, 2000) و صنایع غذایی (Zivanovic *et al*., 2005; Draughen, 2004) مورد استفاده قرار می‌گیرند. از مهم‌ترین ترکیبات اسانس می‌توان به الکل‌ها، آلدهیدها، استرها، اترها، کتون‌ها، فنول‌ها و ترپن‌ها اشاره کرد که خاصیت ضدمیکروبی آنها گزارش شده است (Soliman & Badeaa, 2002; Suresh *et al*., 1992; Ouattaraet *et al*., 1997). ترکیبات شیمیایی و اثرات بیولوژیکی اسانس‌های روغنی شامل خواص ضدمیکروبی و کاربردهای بالقوه آنها در محصولات غذایی مورد تحقیق قرار گرفته است (Bakkali *et al*., 2008)، از این رو به‌عنوان یک افزودنی در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Botsoglouet *et al*., 2002 ; Takahashi *et al*., 2004). ممکن است اسانس در ترکیب با فیلم علاوه بر افزایش خاصیت ضدمیکروبی فیلم سبب کاهش نفوذپذیری به بخار آب و همچنین کاهش اکسیداسیون لیپیدی محصول پوشش داده شده با فیلم گردد (Duke & Beckstrom-Sternberg, 1994; Yanishlieva *et al*., 1999).

ترکیبات فعال می‌توانند خواص ضدمیکروبی فیلم کیتوزان را بهبود بخشند که در این بین می‌توان به اثر اسانس بر خواص باکتری‌کشی و قارچ‌کشی فیلم کیتوزان اشاره کرد (Ali *et al*., 2015). اخیراً، اسانس‌های مختلفی مثل میخک، کارواکرول، پونه کوهی و برگ لیمو با کیتوزان ترکیب شده‌اند و خواص ضدمیکروبی خوبی علیه طیف مختلفی از میکروارگانیسم‌ها بدست آمده است (Fernández-Pan *et al*., 2015; Lekjing *et al*., 2016). همچنین Ojagh و همکاران (2010) سازگاری منحصر به فردی بین کیتوزان و اسانس دارچین و نیز بهبود خواص ضدمیکروبی فیلم تولیدی را گزارش کردند. فیلم‌های محتوای اسانس دارچین برای پوشش دهی غذاهای فسادپذیر مثل ماهی و ماکیان می‌توانند مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس گزارش Gómez-Estaca و همکاران (2010)، فیلم کیتوزان-ژلاتین غنی شده با اسانس میخک جهت پوشش ماهی در طی انبارمانی سرد استفاده شد و نتایج نشان داد که فیلم زیستی حاوی میخک سبب تاخیر و یا بازداری رشد میکروارگانیسم‌ها و افزایش انبارمانی ماهی گردید.

در این تحقیق اثرات ضدمیکروبی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس*[2] روی باکتری‌های بیماری‌زا و همچنین خاصیت ضدمیکروبی فیلم کیتوزان حاوی اسانس بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* (شرکت باریج اسانس کاشان)، کیتوزان (شنگ بایو کم-چین)، سویه‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلای* و *سالمونلا اینترتیدیس* (کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران)، محیط کشت‌های مولار هینتون آگار و براث (مرک، آلمان) و تریپتوز سوی آگار و براث (اسکارلب، اسپانیا)، گلیسرول (شرکت پانرک، اسپانیا) و اسید استیک خالص (مرک، آلمان) در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند.

ترکیبات شیمیایی اسانس

اسانس اکالیپتوس از شرکت باریج اسانس کاشان تهیه گردید. پس از تهیه اسانس و عبور آن از میکرو فیلترهای 0/45، ظرف حاوی اسانس در فویل آلومینیومی در یخچال در جای تاریک نگهداری شد. آنالیز ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی انجام گردید. این دستگاه از نوع ترموکوئست تریس جی سی 2000 فینیکان (انگلستان) بود. ترکیبات اسانس بر اساس مقایسه مدت زمان بازداری نسبی و اجزای طیف‌های جرمی آنها با مقادیر ذخیره شده در کتابخانه کامپیوتری وایلی و نایست (موسسه ملی استاندارد و فناوری) (Adams, 2001) شناسایی و بر اساس میانگین دو تزریق اسانس تعیین مقدار گردید.

آماده سازی سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت

اشرشیاکلای O157:H، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا اینترتیدیس* و *باسیلوس سرئوس* از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه و در این مطالعه به‌کار رفت. باکتری‌ها روی محیط کشت مولار هینتون آگار در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 18 ساعت کشت و پس از فعال‌سازی، یک لوپ باکتری به 10 میلی‌لیتر مولار هینتون براث تلقیح و به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (دانسیته نوری 0/9 در طول موج 600 نانومتر بیانگر ابتدای فاز سکون می‌باشد). در مرحله بعد برای رسیدن به فاز لگاریتمی رشد، 100 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی آماده شده، در 10 میلی‌لیتر مولار هینتون براث رقیق و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد تا حصول دانسیته نوری 0/2 در طول موج 600 نانومتر نگهداری شد (Salarbashi *et al*., 2014).

---

1 *Myrtaceae*

2 *Eucalyptus globulus*

بررسی خواص ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی[1]

به‌منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد اسانس اکالیپتوس از روش چاهک در میکروپلیت استفاده شد. تریپتوز سوی براث به همراه 0/5 درصد آگار و 5 درصد دی‌متیل‌سولفوکسید در آب مقطر حل و استریل شد. پس از سرد شدن، رقت‌سازی انجام شد. پلیت‌های 96 چاهکی به کمک توزیع 190 میکرولیتر از محیط تریپتوز سوی براث و 10 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی اشاره شده در فوق به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. غلظت اولیه اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. موارد کنترل این آزمایش شامل کنترل مثبت (190 میکرولیتر محیط فاقد اسانس و 10 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی) جهت خنثی نمودن تاثیر ضدباکتریایی دی‌متیل‌سولفوکسید و نیز کنترل منفی برای هر چاهک (200 میکرولیتر محیط اسانس و فاقد باکتری) در نظر گرفته شد. هر غلظت در سه تکرار انجام شد. میکروپلیت با درپوش استریل پوشانده و به مدت 60 ثانیه با 100 دور در دقیقه مخلوط و سپس در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت زمان، رشد میکروبی و کدورت چاهک‌های حاوی اسانس و باکتری در مقایسه با چاهک‌های کنترل با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج 620 نانومتر تعیین گردید. چاهک‌های واجد کدورت از لحاظ رشد مثبت تلقی شدند و کمترین غلظت اسانس که از رشد باکتری جلوگیری نمود و محیط موجود در چاهک مربوط به آن شفاف بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تلقی گردیدند (Kim, 2008).

دیسک دیفیوژن

برای تعیین قطر هاله بازدارندگی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر 25 میلی‌متر تهیه و استریل شدند. روی محیط مولار هینتون آگار 100 میکرولیتر باکتری در دانسیته نوری 0/2 درصد ریخته شد و با میله شیشه‌ای به‌طور کامل پخش گردید. سپس دیسک در مرکز پلیت‌های به قطر 8 سانتی‌متر قرار داده و غلظت‌های 10، 25، 50، 75 و 100 میکرولیتر اسانس روی کاغذ صافی ریخته شد. نمونه کنترل دیسک بدون اسانس در نظر گرفته شد. پس از 24 ساعت قطر هاله اندازه گیری شد (Muriel-Galet *et al*., 2012).

خاصیت بازدارندگی بخار اسانس اکالیپتوس

100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های آماده شده، به‌طور یکنواخت با استفاده از سوآپ استریل، روی محیط تریپتوز سوی آگار پخش گردید. دیسک‌های کاغذی استریل شده به سطح فوقانی پلیت‌ها چسبانده و اسانس اکالیپتوس در پنج سطح غلظت 10، 25، 50، 75 و 100 میکرولیتر به دیسک اضافه شد. در ادامه جهت خروج ترکیبات فرار اسانس، هر یک از پلیت‌ها با پارافیلم محصور و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 24 ساعت نگهداری شدند (Muriel-Galet *et al*., 2012).

اندیس لگاریتم کاهشی

غلظت‌های مختلف اسانس شامل 10، 25 و50 میکرولیتر داخل تریپتوز سوی براث در شرایط کاملاً استریل قرار داده شد و 100 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی رشد (جمعیت میکروبی تقریبی 10^5 CFU/ml) اضافه شد و پس از 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و باتوجه به کدورت محلول، رقت‌سازی و جهت شمارش تعداد میکروب‌ها در تریپتوز سوی آگار کشت داده شدند.

تهیه فیلم

فیلم‌های برپایه کیتوزان بر اساس روش قالب‌گیری تولید می‌شوند (Ojagh *et al*., 2010) و این روش با کمی اصلاحات همراه بود. محلول تشکیل‌دهنده فیلم کیتوزان به وسیله حل کردن 1/5 درصد وزنی- حجمی کیتوزان در محلول آبی محتوای 0/7 درصد استیک اسید تهیه شد و روی یک همزن مغناطیسی در دمای 40 درجه سانتی‌گراد همزده شد. سپس محلول کیتوزان تهیه شده توسط کاغذ واتمن صاف شد تا ناخالصی‌های غیر محلول جدا شود. پس از فیلتر کردن به محلول صاف شده گلیسرول (10 درصد وزن پلیمر) به‌عنوان پلاستی سایزر اضافه گردید و به مدت 10 دقیقه همزده شد. اسانس اکالیپتوس با غلظت 0/5، 1 و 1/5 درصد حجمی- حجمی به محلول اضافه گردید و به مدت 5 دقیقه همزده شد. سپس با استفاده از دستگاه هموژنایزر (D91126، هایدولف، آلمان) محلول به مدت 4 دقیقه با دور 12000 هموژن گردید. محلول شکل گرفته به مدت 10 دقیقه هواگیری شد و 25 میلی‌لیتر در مرکز پلیت (8 سانتی‌متر) ریخته شد. سپس فیلم در داخل آون در دمای 38 درجه سانتی‌گراد خشک گردید. پس از خشک شدن، فیلم از سطح پلیت جدا و مورد ارزیابی قرار گرفت.

خاصیت ضدباکتریایی فیلم زیست‌فعال کامپوزیت کیتوزان حاوی اسانس در محیط مایع

0/25 گرم از فیلم زیست کامپوزیت کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس در 10 میلی‌لیتر تریپتوز سوی براث در شرایط کاملاً استریل قرار داده شد و 100 میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی رشد (جمعیت میکروبی تقریبی 10^5 CFU/ml) اضافه شد و پس از 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و با توجه به

---

1 Minimal Inhibitory Concentration (M.I.C)

کدورت محلول، رقت سازی و جهت شمارش تعداد میکروب‌ها در تریپتوز سوی آگار کشت داده شدند (Muriel-Galet *et al*., 2012).

خاصیت بازدارندگی فیلم زیست‌فعال کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس

100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های آماده شده به‌طور یکنواخت با استفاده از سوآپ استریل روی محیط کشت تریپتوز سوی آگار پخش گردید. فیلم‌های زیست کامپوزیتی کیتوزان حاوی اسانس به قطر 3 سانتی‌متر تهیه و به درب پلیت‌ها برای ارزیابی خاصیت بازدارندگی بخار اسانس اکالیپتوس بدون تماس مستقیم با میکروارگانیسم‌ها چسبانده شدند و به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند. قطر منطقه بازدارندگی به‌عنوان نتیجه گزارش گردید (Muriel-Galet *et al*., 2012).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این تحقیق آزمایشات میکروبی در قالب طرح کاملا تصادفی با 3 تکرار انجام شد. اثر عوامل مورد بررسی با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) ارزیابی گردید و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری 5 درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی اسانس اکالیپتوس

براساس طیف‌سنجی انجام شده شش ترکیب مهم در اسانس شناسایی و در جدول 1 خلاصه شده است. ترکیب اصلی اسانس 1و 8 سینئول ($C_{10}H_{18}O$) بود. رنگ اسانس تقریبا بی‌رنگ متمایل به زرد بود. ثقل ویژه، شاخص انکسار و چرخش نوری به‌ترتیب برابر با 0/904 گرم بر میلی‌لیتر، 1/45 و 2/55 بود.

جدول 1- ترکیبات قابل شناسایی در اسانس اکالیپتوس با استفاده از طیف‌سنج جرمی

ترکیبات اسانس	درصد	شاخص بازداری
1و8 سینئول	78/07	1231
آلفا پینن	3/4	1038
بتا پینن	0/47	1610
لیمونین	7/9	1235
آلفا فلاندرین	0/7	1173
مجموع	90/54	

1 و 8 سینئول ترکیب اصلی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* می‌باشدکه 78/07 درصد از ترکیبات اسانس را تشکیل داده است. بر اساس گزارش Shieh (1996)، Tsiri و همکاران (2003)، Cimanga و همکاران (2002) و Su و همکاران (2006) مهمترین ترکیب اصلی اسانس اکالیپتوس 1و8 سینئول بودکه با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مطابقت داشت. خاصیت ضدمیکروبی قوی این ترکیب در اسانس *E. Staigeriana* مقابل باکتری‌های بیماری‌زا و فسادزا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس و فوزاریوم سولانی* (Pitarokili *et al*., 2003)، *اشرشیا کلای و باسیلوس سرئوس* (Sonboli *et al*., 2006) گزارش شده است. بر اساس نتایج محققان فعالیت ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس به ترکیبات شیمیایی آنها (Cimanga, 2002 ; Inouye *et al*., 2001) از قبیل گروه‌های عملگرا (الکل، فنول، ترپن‌ها و کتون‌ها) نسبت داده شده است (Sartorelli *et al* ., 2007). Bakkali و همکاران (2008) دریافتند که ترکیباتی مثل لیمونین، لینالول، گاما- ترپینن، *p-cymene*، آلفاپینن و آلفاترپینول‌ها به‌طور نسبی افزودنی‌های با فعالیت ضدمیکروبی قوی می‌باشند. اگرچه ترکیبات اصلی و غالب اسانس به عنوان عوامل اصلی باکتری‌کشی محسوب می‌شوند اما بعضی از مطالعات نشان می‌دهند که ترکیبات با مقدار کم ممکن است اثرات هم‌افزایی داشته باشند (Tyagi & malik, 2011). در این تحقیق اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* دارای لیمونین (7/9 درصد)، آلفا- پینن (3/4 درصد)، بتا- پینن (0/47 درصد) و آلفا– فلاندرین (0/7 درصد) می‌باشد که در جدول 1 به آنها اشاره شده است. ترکیبات اسانس منجر به تخریب غشا و مرگ سلول باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌شوند (Oussalah *et al*., 2006) و به‌علت حضور چنین ترکیباتی، خاصیت ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس می‌تواند افزایش یابد (Gilles *et al*, 2010).

بررسی خواص ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس

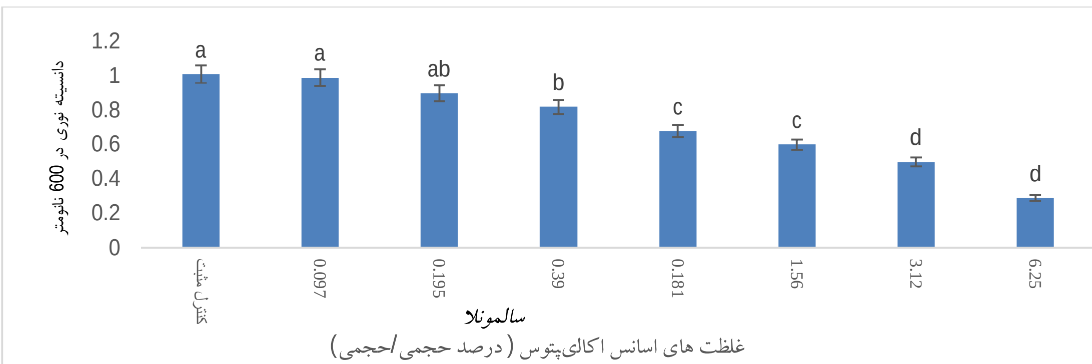
تعیین حداقل غلظت بازدارندگی

تحقیقات جدید بر پایه توسعه و گسترش روش‌های جدید بهبودیافته نگهداری مواد غذایی بنا شده است و به‌علت عدم تمایل مصرف‌کننده از افزودنی‌های مصنوعی، نیاز به جایگزین‌های که مصرف‌کنندگان به‌عنوان عوامل طبیعی قلمداد می‌کنند احساس می‌شود (Bakkali *et al*, 2008). از طرفی افزایش مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به سبب کاهش اثر درمان و به دنبال آن افزایش مرگ و میر می‌تواند یک تهدید اصلی برای سلامت عمومی تلقی گردد (Jones, 2001). از این رو یافتن جایگزین ضدمیکروبی برای درمان میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ضروری است (Coppen, 2002). بر اساس نتایج تحقیقات مختلف، اسانس اکالیپتوس اثرات بیولوژیکی متفاوتی مثل ضدمیکروبی، ضدقند خون و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی دارد (Botsoglouet *et al*., 2002 ; Takahashi *et al*., 2004).

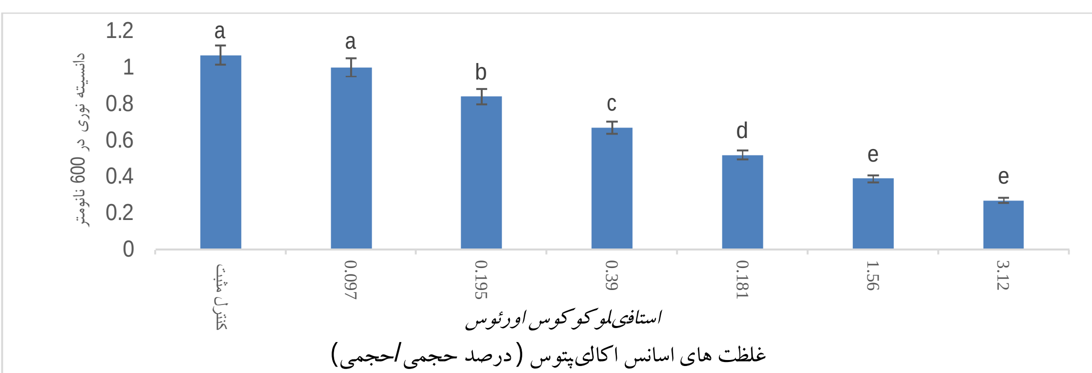
دانسیته نوری حاصل از 24 ساعت گرم‌خانه‌گذاری باکتری *اشرشیا کلای O157:H7* ، *سالمونلا اینترتیدیس*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در رقت‌های مختلف در اشکال 1، 2، 3 و 4 نشان داده شده است. حداقل غلظت بازدارنده به‌عنوان حداقل غلظتی از اسانس که مانع رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود تلقی می‌گردد. حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری‌های گرم منفی برابر با 3/12 میکروگرم بر میلی‌لیتر (شکل 1 و 2) و برای باکتری‌های گرم مثبت 1/56 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (شکل 3 و 4).



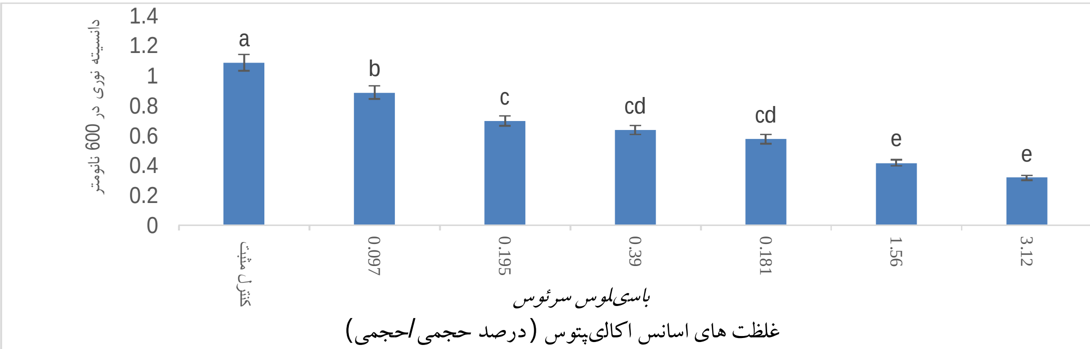
شکل1- میانگین دانسیته نوری مربوط به رشد *اشرشیا کلای* طی تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس اکالیپتوس.کنترل مثبت فاقد اسانس بود.



شکل2- میانگین دانسیته نوری مربوط به رشد *سالمونلا اینترتیدیس* طی تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس اکالیپتوس.کنترل مثبت فاقد اسانس بود.



شکل 3- میانگین دانسیته نوری مربوط به رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* طی تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس اکالیپتوس.کنترل مثبت فاقد اسانس بود.



شکل 4- میانگین دانسیته نوری مربوط به رشد *باسیلوس سرئوس* طی تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس اکالیپتوس.کنترل مثبت فاقد اسانس بود.

براساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت از مقاوم بیشتری برخوردار بودند که دلیل این پدیده را می‌توان به اختلاف ساختار باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت نسبت داد و همان‌طوری که می‌دانیم ترکیبات لیپو پلی‌ساکاریدی در غشای سلول باکتری‌های گرم منفی دسترسی به غشا را محدود می‌سازد (Tyagi & malik, 2010). در تطابق نتایج بدست آمده، حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی در مقابل *اشرشیا کلای* نسبت به *لیستریا مونوسایتوژنز* کمتر بود (کشیری و همکاران، 1393).

خواص ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس و بخارات آن به روش انتشار دیسک

نتایج قطر هاله بازدارندگی رشد علیه باکتری‌های مورد بررسی در تماس مستقیم با سطح محیط کشت (جدول 2) و بخارات حاصل از اسانس (جدول 3) نشان داده شده است . نتایج نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس*) در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیا کلای و سالمونلا اینترتیدیس*) حساسیت بیشتری به اسانس داشتند. بر اساس گزارش محققان باکتری‌های گرم منفی نظیر *سودوموناس آئروژنز* در مقابل اسانس‌ها مقاوم بیشتری از خود نشان دادند (Gilles *et al*, 2010). قطر هاله بازدارندگی رشد ناشی از بخارات اسانس اکالیپتوس در روش دیسکی در مقایسه با تماس مستقیم کمتر بود و همچنین قطر هاله بازدارندگی رشد ناشی از بخارات اسانس باکتری‌های گرم مثبت بیش از گرم منفی بود که با نتایج به‌دست آمده از تاثیر بخارات اسانس *Tamarix boveanan* روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیدیس، اشرشیا کلای، سودوموناس آئروژنز و سالمونلا اینترتیدیس* مطابقت داشت (Saidana *et al*, 2008). همچنین قطر هاله بازدارنده رشد ناشی از بخارات اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* و *اکالیپتوس کامالدولینسیس*[1] مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلای* توسط Ghalem و Mohamed (2008) گزارش شده است.

Vilela و همکاران (2009) فعالیت ضدمیکروبی اسانس برگ *اکالیپتوس گلوبولوس* و نیز ترکیب اصلی 1 و 8 سینئول علیه قارچ‌های انباری *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* را از طریق تماس مستقیم و بخارات مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققان نشان داد مقدار اسانس اکالیپتوس برای بازدارندگی کامل علیه قارچ‌های انباری با روش بخارات اسانس در مقایسه با تماس مستقیم کمتر بود که با نتیجه این تحقق مطابقت نداشت. گرچه محققان ترکیبات اسانس را آنالیز کرده‌اند، اما ترکیبات فرار در اتمسفر پتری دیش را مورد مطالعه قرار نداده‌اند، بنابراین این ترکیبات می‌توانند فعالیت ضدقارچی بالایی داشته باشند (Zivanovic *et al*., 2005).

خواص ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس در محیط مایع

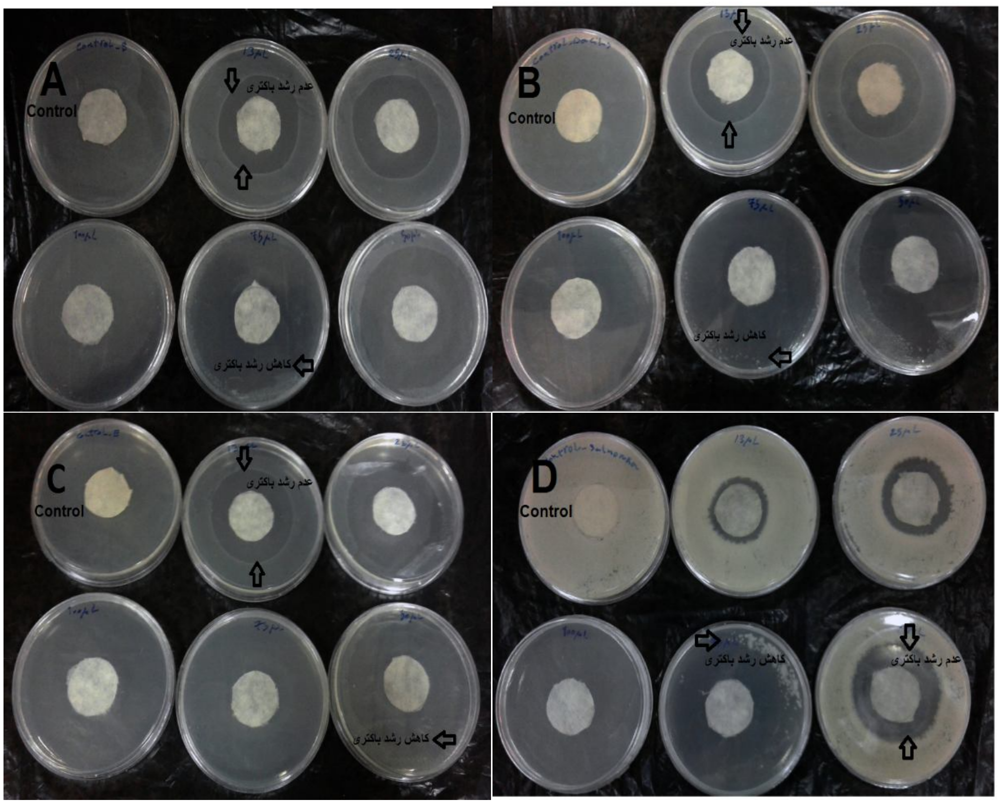
اثر اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* در غلظت‌های 10، 25 و 50 میکرولیتر در تماس مستقیم با محیط مایع (در دمای 37 درجه سانتی‌گراد) مورد ارزیابی و نتایج در جدول 4 نشان داده شده است. همان طوری که مشاهده می‌شود بیشترین کاهش لگاریتمی رشد علیه باکتری‌های مورد بررسی در غلظت 50 میکرولیتر بود. نتایج این تحقیق نشان داد *سالمونلا اینترتیدیس* در مقایسه با سایر باکتری‌ها از مقاومت بیشتری برخوردار بود و همچنین اثر افزودن مقادیر 10 و 25 میکرولیتر نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت به ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* از حساسیت بیشتری برخوردار بود. بنابراین مطابق با نتایج Sonboli و همکاران (2006) و Pitarokili و همکاران (2003) اسانس اکالیپتوس می‌تواند به‌طور موثری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری نماید.

1.Eucalyptus camaldulensis

جدول 2- تاثیر مقادیر مختلف اسانس اکالیپتوس برحسب میکرولیتر بر مهار رشد باکتری (قطر هاله بازدارنده به‌صورت میلی‌متر گزارش شده است).

غلظت اسانس(µl) / باکتری	10	25	50	75	100
اشرشیا کلای	33 ± 0/95b	c25 40 ± 1/	c2 45 ± 1/	+	+++
سالمونلا اینترتیدیس	b30 ± 1	d37 ± 0/9	d42 ± 1/01	+	+++
باسیلوس سرئوس	a91 42 ± 0/	b11 45 ± 1/	b06 60 ± 1/	+++	+++
استافیلوکوکوس اورئوس	a44 ± 1/15	a48 ± 0/5	a65 ± 0/81	+++	+++

+ میکروارگانیسم به مقدار خیلی کمی رشد کرد. +++ هیچ میکروارگانیسمی رشد نکرد و بازدارندگی کامل رشد مشاهده گردید.



شکل 5- تاثیر مقادیر مختلف اسانس اکالیپتوس برمهار رشد باکتری (قطر هاله بازدارنده به‌صورت میلی‌متر گزارش شده است).

*A استافیلوکوکوس اورئوس- B باسیلوس سرئوس- C اشرشیا کلای- D سالمونلا اینترتیدیس.

جدول 3- تاثیر مقادیر مختلف بخار اسانس اکالیپتوس بر حسب میکرولیتر بر مهار رشد باکتری (قطر هاله به صورت میلی‌متر گزارش شده است).

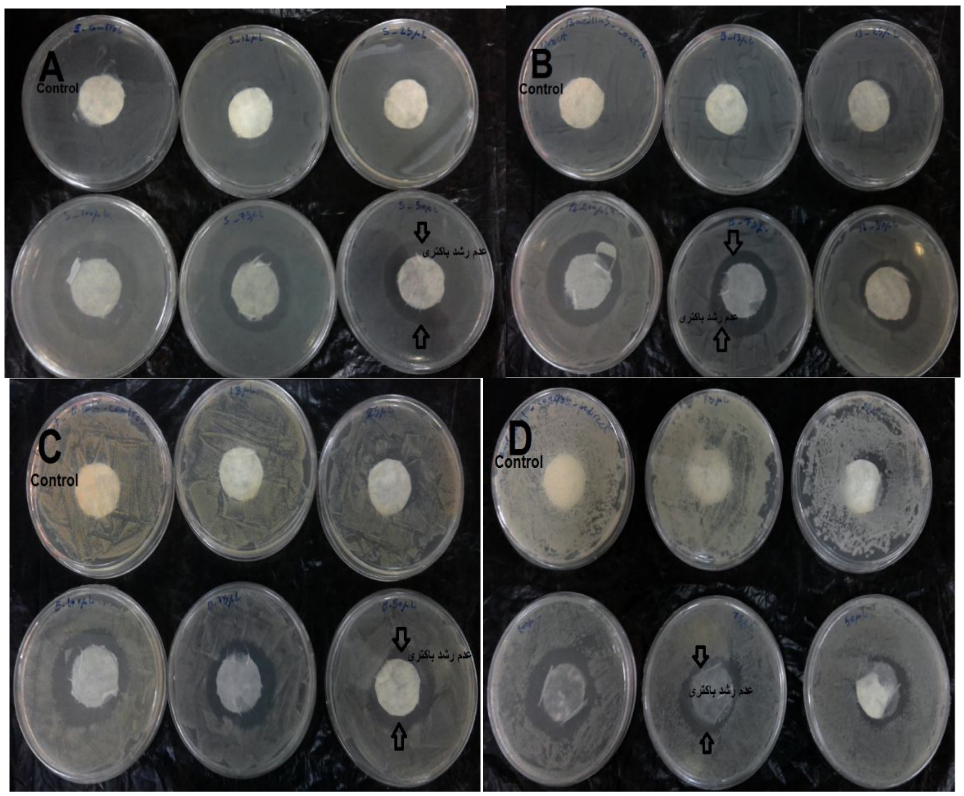
غلظت اسانس (µl) / باکتری	10	25	50	75	100
اشرشیا کلای	c6 20 ± 0/	b4 26 ± 0/	c 32 ± 1	c01 35 ± 1/	c94 40 ± 0/
سالمونلا اینترتیدیس	d15 ± 0/45	b25 ± 0/91	d30 ± 0/5	d33 ± 0/8	d38 ± 0/3
باسیلوس سرئوس	b9 22 ± 0/	a04 28 ± 1/	b9 35 ±0/	b56 38 ± 0/	b43 ± 1
استافیلوکوکوس اورئوس	a24 ± 1	a28 ± 0/88	a38 ± 0/33	a40 ± 0/97	a45 ± 0/79

جدول 4- اثرات ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس گلوبولوس در مقادیر 10، 25 و 50 میکرولیتر بر اشرشیا کلای، سالمونلا اینترتیدیس، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس با لگاریتم تعداد واحد کلنی ((Log(CFU)) و اندیس کاهش لگاریتمی (LRV)

باکتری / غلظت اسانس(µl)	*اشرشیا کلای*		*سالمونلا اینترتیدیس*		*باسیلوس سرئوس*		*استافیلوکوکوس اورئوس*	
	Log(CFU) /ml	LRV	Log(CFU) /ml	LRV	Log(CFU) /ml	LRV	Log(CFU) /ml	LRV
شاهد میکروبی	8/70±0/04		8/11±0/02		8/95±0/04		9/03±0/05	
10	7/40±0/01	[a]1/30	7/31±0/01	[a]0/8	7/32±0/02	[a]1/63	7/38±0/02	[a]1/65
25	6/33±0/02	[b]2/37	6/98±0/03	[b]1/13	5/63±0/09	[b]3/32	5/56±0/04	[b]3/47
50	+++		5/05±0/02	[c]3/06	+++		+++	

+++ هیچ میکروارگانیسمی رشد نکرد و بازدارندگی کامل رشد مشاهده گردید.

*اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها ($p< 0.05$) به صورت حروف کوچک در هر ستون نشان داده شده ست. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 95 درصد می‌باشد($p< 0.05$)



شکل 6- تاثیر مقادیر مختلف بخار اسانس اکالیپتوس بر مهار رشد باکتری (قطر هاله به‌صورت میلی‌متر گزارش شده است).

*A استافیلوکوکوس اورئوس- B باسیلوس سرئوس- C اشرشیا کلای- D سالمونلا اینترتیدیس

خواص ضدمیکروبی بخار اسانس اکالیپتوس در ترکیب با فیلم کیتوزان

ترکیبات ضدمیکروبی فرار از طریق مهاجرت در فضای موجود در بسته‌بندی و ترکیبات ضدمیکروبی غیر فرار به‌صورت مواد حل‌شونده در تماس بین ماده بسته‌بندی و غذا می‌تواند اثرات ضدمیکروبی نشان دهند (Shan *et al.*, 2007). همان‌طوری که در جدول 5 مشاهده می‌شود، بخار اسانس در فیلم زیست کامپوزیتی کیتوزان در سطح 0/5 درصد تاثیر مثبتی نداشت و در سطح 1 و 1/5 درصد خاصیت بازدارندگی کمی نشان داد و سبب کاهش دانسیته میکروبی در سطح پلیت گردید. همچنین فیلم زیست کامپوزیت کیتوزان بدون اسانس فاقد هرگونه فعالیت ضدباکتریایی بود. نتایج بدست آمده از این تحقیق با گزارش کشیری و همکاران (1393) مبنی بر عدم افزایش فعالیت ضدمیکروبی فاز بخار فیلم زیست‌فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی مطابقت داشت.

جدول 5- تاثیر غلظت اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* در فیلم زیست کامپوزیت کیتوزان بر مهار رشد باکتریایی در فاز بخار

نوع میکروارگانیسم	فیلم حاوی 0/5 درصد اسانس	فیلم حاوی 1 و 1/5 درصد اسانس
اشرشیا کلای	---	+++
سالمونلا اینترتیدیس	---	+++
باسیلوس سرئوس	---	+++
استافیلوکوکوس اورئوس	---	+++

--- قطر هاله بازدارندگی رشد مشاهده نشد. +++ دارای محدوده بازدارندگی و کاهش قابل ملاحظه دانسیته میکروبی در سطح پلیت

خواص ضدمیکروبی فیلم زیست‌فعال کیتوزان در محیط مایع

با توجه به‌اینکه بخار اسانس اکالیپتوس در ترکیب با فیلم کیتوزان خاصیت ضدمیکروبی مناسبی نشان نداد در این تحقیق اثر ضدمیکروبی فیلم زیست‌فعال کیتوزان در تماس مستقیم با محیط مایع در دمای 37 درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد. همان‌طوری که در جدول 6 مشاهده می‌شود، اندیس کاهش لگاریتمی فیلم زیست فعال کیتوزان حاوی 0/5 درصد اسانس در برابر *اشرشیا کلای*، *سالمونلا اینترتیدیس*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب برابر 2/56، 2/34، 2/54 و 2/59 لگاریتم بود و با افزایش غلظت اسانس در برابر باکتری‌های مورد آزمایش افزایش یافت.

همسو با نتایج این تحقیق با سایر محققان، کیتوزان خالص *لیستریا مونوسیتوژنز* را 2 لگاریتم کاهش داد در حالی که فیلم کیتوزان حاوی 1 و 2 درصد اسانس پونه کوهی تعداد لگاریتم کاهشی *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلای* را به‌ترتیب 4 لگاریتم و 3 لگاریتم کاهش داد (Zivanovic *et al*., 2005) و در تطابق با تحقیق انجام شده، با افزایش غلظت اسانس خاصیت ضدمیکروبی افزایش می‌یابد. همچنین همسو با نتایج این تحقیق با سایر محققان می‌توان به افزایش اندیس کاهش لگاریتمی در فیلم اتیلن وینیل الکل حاوی 10 درصد اسانس پونه کوهی (Muriel-Galet *et al*., 2012)، فیلم زیست‌فعال زئین حاوی 10 درصد اسانس آویشن شیرازی (کشیری و همکارن، 1393) و فیلم‌های نشاسته حاوی تانیک اسید (Pyla *et al*., 2010) در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلای* اشاره کرد.

جدول 6- اثرات ضدمیکروبی فیلم زیست فعال کیتوزان حاوی 0/5، 1 و 1/5 درصد اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* بر *اشرشیا کلای*، *سالمونلا اینترتیدیس*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با لگاریتم تعداد واحد کلنی ((Log(CFU)) و اندیس کاهش لگاریتمی (LRV)

باکتری / فیلم	*اشرشیا کلای*		*سالمونلا اینترتیدیس*		*باسیلوس سرئوس*		*استافیلوکوکوس اورئوس*	
	Log(CFU)/ml	LRV	Log(CFU)/ml	LRV	Log(CFU)/ml	LRV	Log(CFU)/ml	LRV
شاهد میکروبی	8/94 ± 0/06		± 0/09 8/80		0/03±8/94		0/03±8/92	
کیتوزان	7/13 ± 0/03	^{d}1/81	± 0/04 7/06	^{d}1/73	± 0/04 7/09	^{d}1/85	± 0/53 6/63	^{d}2/28
کیتوزان و ٪ 0/5 اسانس	6/38 ± 0/02	^{c}2/56	± 0/01 6/46	^{c}2/34	± 0/01 6/40	^{c}2/54	± 0/02 6/32	59 ^{c}2/
کیتوزان و ٪1 اسانس	6/06 ± 0/03	^{b}2/88	± 0/05 6/05	^{b}2/74	± 0/03 6/01	^{b}2/93	± 0/04 5/91	^{b}3
کیتوزان و ٪1/5 اسانس	4/72 ± 0/1	^{a}4/22	± 0/14 4/82	^{a}3/98	4/39 ± 0/1	^{a}4/55	4/21 ± 0/1	^{a}4/71

*اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها ($p< 0.05$) به‌صورت حروف کوچک در هر ستون نشان داده شده ست. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 95 درصد می‌باشد ($p< 0.05$) .

نتیجه‌گیری

فعالیت ضدمیکروبی اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* در برابر *اشرشیا کلای*، *سالمونلا اینترتیدیس*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* براساس قطر هاله، رهایش ترکیبات موثر در محیط مایع و تبخیر اسانس در محیط جامد مطلوب بود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* قابلیت ضدمیکروبی خوبی علیه دامنه وسیعی از باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی دارد و باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی در برابر

اسانس از حساسیت بیش‌تری برخوردار بودند. فیلم زیست‌فعال کیتوزان از خواص ضدمیکروبی خوبی در محیط مایع برخوردار بود. با توجه به نتایج حاصل از خواص ضدمیکروبی فیلم بر پایه بخار اسانس در محیط جامد، فیلم زیست‌فعال کیتوزان حاوی 1/5 درصد اسانس *اکالیپتوس گلوبولوس* در تماس مستقیم با پلیمر می‌تواند علیه باکتری‌های بیماری‌زا به‌طور موفق عمل نماید.

افزودن مستقیم مواد ضدمیکروبی به درون ماده غذایی ممکن است روی خواص حسی آن تاثیر نامطلوبی دشته باشد، بنابراین افزودن ماده ضدمیکروبی به درون مواد بسته‌بندی می‌تواند چنین اثراتی را کاهش دهد. ماده بسته‌بندی آزاد سازی این ترکیبات را روی سطح ماده غذایی کنترل می‌کند و سبب می‌شود که غلظت این ترکیبات همواره بالاتر از حد بحرانی مورد نیاز برای جلوگیری از رشد باکتری‌های مضر باشد. این تحقیق پتانسیل بالای فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس‌های خوراکی را در جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا به اثبات رساند و نشان داد اسانس اکالیپتوس در ترکیب با فیلم کیتوزان، جایگزین مناسبی برای پاسخ به نگرانی‌های مصرف کنندگان و افزایش ارتقاء کیفیت مواد غذایی می‌باشد و می‌توان از چنین بسته‌بندی‌هایی برای افزایش طول عمر مواد غذایی سود برد.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و اساتید راهنما و مشاور جهت حمایت‌های خالصانه آن‌ها در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

کشیری، م.، مقصودلو، ی.، خمیری، م. و بهروز، ر.، 1393، ارزیابی خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره 50، ص 195-206.

Adams, R. P., 2001, Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole. Mass spectroscopy. Allured, *Carol Stream*, Illnois. New York: Spinger

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M., 2008, Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.

Botsoglou, N. A., Christaki, E., Fletouris, D. J., Florou-Paneri, P. & Spais, A. B., 2002, The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science*, 62(2), 259-265.

Brooker, M. & Kleinig, D. A., 2004, Field Guide to Eucalyptus. 2nd Edn., Vol. 8. Melbourne : Bloomings Books.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., & Vlietinck, A. J., 2002, Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of ethnopharmacology*, 79(2), 213-220.

Coppen, J. J. W., 2002, Eucalyptus: The Genus Eucalyptus (Mediacinal and Aromatic Plants–Industrial Profiles). London and NewYork: *Taylor and Francis*, 440.

Draughon, F. A., 2004, Use of botanicals as biopreservatives in foods. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 58(2), 20-28.

Duke, J. A. & Beckstrom-Sternberg, S., 1994, Potential for synergistic action of phytochemicals in spices. In: Amsterdam: *Elsevier Science*.

Ghalem, B. R. & Mohamed, B., 2008, Antibacterial activity of leaf essential oils of Eucalyptus globulus and Eucalyptus camaldulensis. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 211–215.

Ghanem, A. & Skonberg, D., 2002, Effect of preparation method on the capture and release of biologically active molecules in chitosan gel beads. *Journal of applied polymer science*, 84(2), 405-413.

Gilles, M., Zhao, J., An, M. & Agboola, S., 2010, Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*, 119, 731–737.

Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J. & Galotto, M. J., 2011, The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International journal of food microbiology*, 146(2), 144-150.

Inouye, S., Takizawa, T. & Yamaguchi, H., 2001, Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 565–573.

Jones, R. N., 2001, Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest Journal*, 119(2_suppl), 397S-404S.

Kim, S., 2008, Processing and properties of gluten/zein composite. Bioresource technology, 99(6), 2032-2036.

Kurita, K., 2006, Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203-226.

Lis-Balchin, M., Hart, S. L. & Deans, S. G., 2000, Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (Melaleuca alternifolia, Leptospermum scoparium or Manuka and Kunzea ericoides or Kanuka), originating in Australia and New Zealand. *Phytotherapy research*, 14(8), 623-629.

Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., LopezCarballo, G., Lara, M., Gavara, R. & Hernandez-Munoz, P., 2012,

Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology*. 157: 195–201.
Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., López-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R. & Hernández-Muñoz, P., 2012, Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International journal of food microbiology*, 157(2), 195-201.
Ojagh, S. M, Rezaei, M., Razavi, S. H. & Hosseini, S. M. H., 2010, Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122,161-166.
Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P. & Bégin, A., 1997, Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International journal of food microbiology*, 37(2), 155-162.
Oussalah, M., Caillet, S. & Lacroix, M., 2006, Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. *Journal* of *food protection*, 69,1046–1055.
Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A. & Harvala, C., (2003). Volatile metabolites from Salvia fruticosa as antifungal agents in soilborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3294–3301.
Pyla, R., Kim, T. J., Silva, J. L. & Jung, Y. S., 2010, Enhanced antimicrobial activity of starch-based film impregnated with thermally processed tannic acid, a strong antioxidant. *International journal of food microbiology*, 137(2), 154-160.
Quintavalla, S. & Vicini, L., 2002, Antimicrobial food packaging in meat industry. Meat science, 62(3), 373-380.
Saidana, D., Mahjoub, M. A., Boussaada, O., Chriaa, J., Cheraif, I., Daami, M & Helal, A. N., 2008, Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of Tamarix boveana (*Tamaricaceae*). *Microbiological research*, 163(4), 445-455.
Salarbashi, D., Tajik, S., Shojaee-Aliabadi, S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R. & Noghabi, M. S., 2014, Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated Zataria multiflora Boiss and Mentha pulegium essential oils. *Food chemistry*, 146, 614-622.
Sartorelli, P., Marquioreto, A. D., Amaral-Baroli, A., Lima, M. E. & Moreno, P. R., 2007, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of Eucalyptus. Phytotherapy Research, 21, 231–233.
Shan, B., Cai, Y., Brooks, J. D. & Corke, H., 2007, Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (Cinnamomum burmannii): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (14): 5484–5490.
Shen, L., Worrell, E. & Patel, M., 2010, Present and future development in plastics from biomass. Biofuels, *Bioproducts and Biorefining*, 4(1), 25-40.
Shieh, J. C., 1996, Yields and chemical components of essential oils in Eucalyptus camaldulensis leaves. Taiwan *Journal of Forest and Science*, 11, 149–157.
Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L. & Matos, F. J. A., 2003, Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of ethnopharmacology*, 89(2), 277-283.
Soliman, K. M. & Badeaa, R. I., 2002, Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and chemical toxicology*, 40(11), 1669-1675.
Sonboli, A., Babakhani, B. & Mehrabian, A. R., 2006, Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from Salvia. Zeitschrift für Naturforschung C, 61, 160–164.
Su, Y. C., Ho, C. L., Wang, E. I. & Chang, S. T., 2006, Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalyptus. Taiwan Journal of Forest and Science, 21, 49–61.
Suresh, P., Ingle, V. K. & Vijayalakshmi, V., 1992, Antibacterial activity of eugenol in comparison with other antibiotics. *Journal of food science and technology*, 29(4), 254-256.
Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N. A., 2003, Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *National Center of Biotechnology Information*, 43(2):71-145
Takahashi, T., Kokubo, R. & Sakaino, M., 2004, Antimicrobial activities of Eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculate. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 60–64.
Tsiri, D., Kretsi, O., Chinou, I. B. & Spyropoulos, C. G., 2003, Composition of fruit volatiles and annual changes in the volatiles of leaves of Eucalyptus camaldulensis Dehn growing in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 244–247.
Tyagi, A. & Malik, A., 2010, In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapour phase against Candida albicans. *Micron*, 41, 797–805.
Tyagi, A. K. & Malik, A., 2011, Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptusglobulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235.
Vilela, G. R., de Almeida, G. S., D'Arce, M. A. B. R., Moraes, M. H. D., Brito, J. O., da Silva, M. F. D. G., & da Gloria, E. M., 2009, Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from Eucalyptus globulus Labill., against the storage fungi Aspergillus flavus Link and Aspergillus parasiticus Speare. *Journal of Stored*

Products Research, 45(2), 108-111.

Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H. & Raneva, V. G., 1999, Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64(1), 59-66.

Zheng, L. Y. & Zhu, J. F., 2003, Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polymers, 54(4), 527-530.

Zivanovic, S., Chi, S. & Draughon, A. F., 2005, Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*, 70(1), M45-M51.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 5, Dec- Jan 2018, p. 784-797

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 5، آذر - دی 1396، ص. 797-784

Evaluation of antibacterial activity of chitosan bioactive film containing *Eucalyptus globulus* essentoil oil

E. Azadbakht[1], Y. Maghsoudlou[2]*, M. khomeiri[3], M. Kashiri[4]

Received: 2016.07.04
Accepted: 2016.10.29

Introduction: The edible films and coatings had remarkable growth in recent years to increase the shelf life and to enhance food quality, stability, and safety and expected to have an important impact on the food market in the following years. In addition, these matrices can be used as carriers of antimicrobials to minimize the risk of foodborne contamination by pathogens and inhibit the development of spoiler microbes. Antimicrobial packaging is a type of active packaging that provides the continuous migration of antimicrobial components to the surface of the foods. Chitosan is a linear copolymer of β-1, 4-linked D-glucosamine and N-acetyl-d-glucosamine. It is a cationic polysaccharide for food packaging applications, due to its unique characteristics of films, including excellent oxygen barrier properties, good mechanical properties, nontoxicity and good antimicrobial activity. *Eucalyptus* is a plant native from Australia and the *Myrtasya* family that includes about 900 species and sub-species. There is abundant scientific evidence regarding the efficacy of different species *Myrtasya* as the antibacterial and antifungal compounds used in health products, and food industry. Using natural antimicrobials are interesting strategies for reducing the use of chemical additives in the food industry. Essential oils (EOs) are defined as a mixture of volatile water insoluble substances to be incorporated into the edible films due to exhibit antimicrobial effects. Moreover, evaluation EOs on the physical, optical and structural properties of the resulting film is also important. Therefore, the aims of this work were to determine the effect Eucalyptus globulus essential oil on antibacterial properties (2) to determine the antimicrobial activity of chitosan based films containing Eucalyptus globulus essential oil against S. aureus, B. cereus, E. coli and S. intertidis.

Materials and methods: The foodborne microbial strains were prepared from Persian Type Culture Collection. The essential oil was analyzed by gas chromatography (GC) (Thermoquest 2000, UK). In this study, the antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* essential oils (EGO_s) was evaluated against two gram positive (*S. aureus* and *B. cereus*) and two gram negative (*E. coli* and *S. intertidis*) bacteria by the agar diffusion technique and microdilution test. The effect of EGO was evaluated in liquid media and vaporous phase too. Chitosan solution were prepared by dissolving 1.5 % (W/V) of chitosan in aqueous solution containing 0.7% (V/V) of acetic acid under a magnetic stirrer at 40°C until chitosan was completely dissolved. Glycerol as plasticizer (10% weight of chitosan powder) was added to the solution and stirred for 10 minutes. The EGO with concentrations of 0.5, 1 and 1.5% v/v was added to the solution and was stirred for 5 minutes. The film forming solutions using a homogenizer (Heidolph, Germany) were homogenized with 12000 rpm for 4 min, then degassed for 5 min and 25 ml were cast on a 10 cm diameter petri dish. After drying the film in the oven at 38°C for 24 h, they were peeled from the plate surface and were evaluated. The antimicrobial activity of the films was evaluated in contact with liquid and vaporous media.

Results and discussion: Minimum inhibition concentration for gram negative (*E. coli*, *S. enteritidis*) and gram positive (*B. cerus* and *S. aureus*) bacteria showed 3.125 and 1.562 µg/l respectively. The inhibition zone for gram positive bacteria was bigger than gram negatives. The effect of EGO on bacteria based on Log reduction value (LRV) of S. aerus > *B. cerus* > *E. coli*> *S. enteritidis*. Thses results confirmed that gram positive bacteria were more sensitive to inhibition by plant essential oils than the gram-negative bacteria. Our results showed that chitosan film containing 1 and 1.5 % essential oil was able to reduce the density of bacteria. The Log reduction value of chitosan bioactive film was increased by increasing the concentration of *E. globulus* essential oil than 0.5 to 1.5 % in liquid media. The results of this work had demonstrated that chitosan bioactive

1, 2, 3 and 4. . M. Sc, Professor, Associate Professor and Assistant Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
(*Corresponding author: yahyamaghsoudlou@gmail.com)

film containing 1.5% EGO can be used an effective antimicrobial film for food packaging in direct contact.

Conclusion: Chitosan is a good biopolymer for active food packaging. The result of this study showed that chitosan films containing EGO could be used as active films due to enhanced the antimicrobial properties which are important in food packaging applications. Films containing essential oil had unique properties that are useful for coating of perishable foods such as fish and poultry.

Key words: Antimicrobial packaging, *Eucalyptus globolus* essential oil (EGO), Chitosan